

WO 019417

Anita

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年1月24日 (24.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/06809 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>:  
C12M 1/00, G01N 33/483

G01N 27/30, 27/416,

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 行政哲男(YUKI-MASA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒573-1122 大阪府枚方市西船橋二丁目10-1-206 Osaka (JP). 岡 弘章(OKA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒573-1194 大阪府枚方市中宮北町3-10 枚方ガーデンヒルズ913号室 Osaka (JP). 小川竜太(OGAWA, Ryuta) [JP/JP]; 〒574-0031 大阪府守口市橋波東之町1-4-15 パレラガール603 Osaka (JP). 杉原宏和(SUGIHARA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒576-0054 大阪府交野市幾野1-10-630 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号:  
PCT/JP01/06067(22) 国際出願日:  
2001年7月12日 (12.07.2001)(25) 国際出願の言語:  
日本語(26) 国際公開の言語:  
日本語(30) 優先権データ:  
特願2000-213531 2000年7月13日 (13.07.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP).

(74) 代理人: 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku); 〒540-6015 大阪府大阪市中央区見一丁目2番27号 クリストタルタワー15階 Osaka (JP).

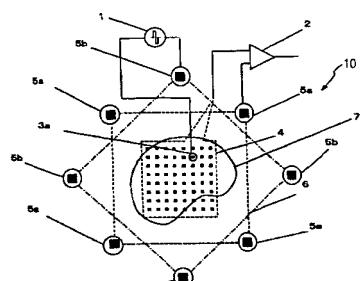
(81) 指定国(国内): CA, CN, KR, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[続葉有]

(54) Title: EXTRACELLULAR RECORDING INTEGRATED COMPOSITE ELECTRODE

(54) 発明の名称: 細胞外記録用一体化複合電極



(57) Abstract: An integrated composite electrode for measuring an electrophysiologic characteristic of a biological sample comprising microelectrodes arranged in a first area on a substrate and reference electrodes arranged in a second area on the substrate and including one or more stimulating reference electrodes for imparting electric signals to the microelectrodes. Preferably, the reference electrodes include one or more measuring reference electrodes for measuring electric signals from the microelectrodes, and the stimulating reference electrodes are insulated from the measuring reference electrodes in an electric circuit way. Preferably, the second area is provided at a distance from the periphery of the first area and encompasses it.

(57) 要約:

生物学的試料の電気生理学的特性を測定するための一体化複合電極であって、基板上の第1の領域に配置された複数の微小電極、および基板上の第2の領域に配置された参照電極を備え、この参照電極は、微小電極に電気信号を付与するための1つ以上の刺激用参照電極を含む一体化複合電極。好ましくは、上記参照電極は、上記複数の微小電極からの電気信号を検出するための1つ以上の測定用参照電極を含み、上記刺激用参照電極は、上記測定用参照電極と電気回路的に絶縁されている。好ましくは、上記第2の領域は、上記第1の領域の周縁から間隔を置いて配置され、かつ前記第1の領域を取り囲む。

WO 02/06809 A1



添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書  
細胞外記録用一体化複合電極

### 技術分野

5 本発明は、生体活動の電気的計測、特に神経細胞の活動に伴う電位変化などを測定するための、神経電気生理の分野で有用な、細胞外記録用一体化複合電極、およびそれを備えた細胞電位測定装置に関する。

### 背景技術

10 近年、神経細胞の医学的検討、および神経細胞を電気素子として利用する検討が活発に行われている。神経細胞などが活動する際には活動電位が発生する。活動電位は、神経細胞のイオン透過性の変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化し、これにより細胞膜電位が変化することによって生じる。そこで、神経細胞近傍の電位変化を測定すれば、神経細胞の活動を観察することが可能である。

15 従来、上記のような細胞活動に伴う活動電位は、マイクロマニュピレータなどを用いて細胞近傍に配置されたガラス製の細胞外電位測定用電極または金属製(白金など)の電極を用いて測定されていた。あるいは、細胞活動に伴う活動電位は、上記と同様の電極を細胞内に挿入することにより測定されていた。

しかし、上記いずれの従来方法も、電極の調製に熟練した技術を要すること、電極のインピーダンスが高く、外部雑音の影響を受けやすいこと、さらに、電極を細胞内に挿入する方法では細胞または組織に傷害を与えること、などの問題点があった。このため、生物学的試料の安定した長期間の観察には適さなかった。

本発明者らは、絶縁性基板上に導電性物質を用いて複数の微小電極とその引き出しパターンを形成し、この上での細胞および組織培養を可能にした一体化複合電極を開発した(特開平6-78889号公報および特開平6-296595号公報)。この一体化複合電極は、細胞、組織などの生物学的試料に傷害を与える

ことなく、神経細胞の観察を安定にかつ長期間にわたって行うことが可能である。この一体化複合電極では、電解によって、細胞と近接する電極の最表面に白金黒の多孔性のメッキを施し（特開平6-78889号公報）、インピーダンスを実用的なレベルである約 $50\text{ k}\Omega$ 以下に調整する。

5 この一体化複合電極では、神経細胞の活動電位を測定する際に、例えば、組織のある部位における神経細胞に外部から電流もしくは電圧による刺激を加え、この刺激に対する他の部位の反応を観察することによって組織内の神経ネットワークの解析等が可能となる。この場合、刺激は、一体化複合電極上の複数の微小電極中の、刺激を加えるのに最も適した部位における微小電極を刺激電極として選  
10 択し、その周辺の任意の微小電極を基準電極として、この二つの微小電極間に刺激を加え、複数の微小電極の反応電位を測定する。

ところが、上記刺激電極の周りの基準電極上には、他の細胞または組織が存在しており、外部から電流または電圧による刺激を入れた場合、刺激電極上の細胞のみならず、基準電極上の細胞までも刺激されてしまい、所望する信号が正しく  
15 測定できない場合が多くあった。また、基準電極のインピーダンスが上昇してしまった場合、外部雑音の影響や、刺激によるアーチファクトが大きくなることは避けられなかった。

## 発明の開示

20 本発明は上記問題点の解決を意図するものであり、その目的は、外部雑音の影響を受けにくく、刺激によるアーチファクトを低減し、細胞の電気的信号を記録するのに適した一体化複合電極を提供することにある。

本発明者らは、細胞外記録用一体化複合電極の作成において、基準電極として用いる参照電極を、刺激電極と十分離れた位置に配置し、参照電極上に細胞または組織が存在しないようにすることによって、外部雑音の影響を受けにくく、刺激によるアーチファクトが低減することを見出し本発明を完成するに至った。

さらに、刺激用参照電極と測定用参照電極が電気的に独立していることによつて、上記外部雑音の影響と刺激によるアーチファクトの低減に対し、さらなる効果が発揮されることを見出して本発明を完成するに至った。

本発明は、生物学的試料の電気生理学的特性を測定するための一体化複合電極  
5 に関し、この一体化複合電極は、基板上の第1の領域に配置された複数の微小電極、および基板上の第2の領域に配置された参照電極を備え、この参照電極は、微小電極に電気信号を付与するための刺激用参照電極を含む。

好ましくは、上記参照電極は、上記複数の微小電極からの電気信号を検出するための1つ以上の測定用参照電極を含み、上記刺激用参照電極は、上記測定用参考  
10 照電極と電気回路的に絶縁されている。

好ましくは、上記第2の領域は、上記第1の領域の周縁から間隔を置いて配置され、かつ前記第1の領域を取り囲む。

好ましくは、上記生物学的試料は、前記第1の領域と重複し、かつ前記第2の領域とは重複しないように配置される。

好ましくは、上記間隔は、電気信号が付与される微小電極から発生する電気信号を検出し、かつ電気信号が付与されない微小電極から発生する電気的ノイズを検出しないように設定される。  
15

好ましくは、上記参照電極の各々は、上記第1の領域上に配置される上記生物学的試料と重複しないような位置に配置される。

好ましくは、上記間隔は、0.1 mm以上、より好ましくは、1 mm～10 mmの間の範囲である。  
20

好ましくは、上記測定用参照電極の各々は、上記第1の領域の中心から、1 m以上、より好ましくは、5 mm～11 mm離れた位置に配置される。

好ましくは、上記1つ以上の刺激用参照電極または上記1つ以上の測定用参照電極がそれぞれ複数存在する場合、それらの各々は、上記第1の領域の中心に関して互いにほぼ対称に配置される。  
25

好ましくは、上記複数の微小電極は上記第1の領域内でマトリックス状に配置される。

好ましくは、上記一体化複合電極は、上記微小電極の各々に電気信号を付与しまたは該微小電極から電気信号を導出し得る配線部を備える。

5 本発明は、1つの局面で、上記の一体化複合電極を備え、この一体化複合電極の基板上に生物学的試料を置くための細胞設置領域を有する、一体化細胞設置器に関する。

本発明は、1つの局面で、上記一体化細胞設置器と、生物学的試料の電気生理学的活動による出力信号を処理するために上記微小電極に接続される出力信号処理装置を備え、さらに必要に応じて生物学的試料に電気的刺激を与るために上記微小電極に接続される刺激信号付与装置を備えた、細胞電位測定装置に関する。  
10

本発明はまた、上記細胞電位測定装置を備え、さらに、生物学的試料を光学的に観察するための光学観察装置および／または生物学的試料の培養環境を制御するための細胞培養装置を備えた、細胞電位測定システムに関する。

15

### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の概略ブロック図である。図中の参照番号は、それぞれ以下の部材を示す：1 刺激信号付与装置、  
2 出力信号処理装置、3 a 刺激微小電極、3 b 刺激用基準微小電極、4  
20 微小電極を配置した領域、5 a 測定用参照電極、5 b 刺激用参照電極、6 電気的短絡を表す線。

図2は、従来の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の概略ブロック図である。図中の参照番号は、図1と同じ部材を示す。

25 図3は、本発明の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の、定電流の双極性刺激に対するノイズレベルとアーチファクトを64チャンネルで表示したコンピュータ画面のプリントアウトを示す図である。

図4は、従来の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の、定電流の双極性刺激に対するノイズレベルとアーチファクトを64チャンネルで表示したコンピュータ画面のプリントアウトを示す図である。

図5は、本発明の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の改変例の概略ブロック図である。図中の参照番号は、図1と同じ部材を示し、そしてさらに7は被測定細胞を、10は一体化複合電極をそれぞれ示す。

図6は、従来の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の概略ブロック図である。図中の参照番号は、図5と同じ部材を示す。

図7は、本発明の一体化複合電極の改変例を備えた細胞電位測定装置の、定電流刺激に対するノイズレベルとアーチファクトを64チャンネルで表示したコンピュータ画面のプリントアウトを示す図である。

図8は、従来の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の、定電流刺激に対するノイズレベルとアーチファクトを64チャンネルで表示したコンピュータ画面のプリントアウトを示す図である。

図9は、微小電極が配置された第1の領域と参照電極が配置される第2の領域との関係を示す概念図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をより詳細に説明する。

#### 20 (微小電極および参照電極)

本発明の一体化複合電極は、絶縁性基板上の第1の領域に配置された複数の微小電極を備える。この第1の領域の上に細胞、組織などの生物学的試料を配置することにより、生物学的試料中の細胞の電気的活動を計測することが可能になる。

本発明の一体化複合電極は、微小電極の各々を電気信号により刺激するための基準電極として、複数の微小電極とは異なる1つ以上の参照電極（刺激用参照電極）を備えることを特徴とする。

本発明の一体化複合電極はまた、微小電極の各々からの電気信号を検出するための1つ以上の参照電極（測定用参照電極）を備え得る。上記参照電極（刺激用参照電極および測定用参照電極）は、絶縁性の基板上の第2の領域内に配置される。好ましくは、上記参照電極の各々は、複数の微小電極が配置される第1の領域から十分離れた位置に配置される。好ましくは、刺激用参照電極は、測定用参照電極とは互いに電気回路的に独立している。

本発明の一体化複合電極において、代表的には、複数の微小電極は、基板上の第1の領域内でマトリックス状となるように、すなわち、格子の各交点上に位置するように配置される。この配置により、複数の微小電極を等間隔に配列させ得る。これは、生物学的試料中の隣接する神経細胞を、隣接する微小電極上に位置させて、隣接する細胞間の電気的信号の伝達を検知することを可能とする。

本発明の一本化複合電極において、代表的には、複数の参照電極は、第2の領域内で、上記第1の領域の中心に関して互いに対称の位置に配置され、それによって、刺激によって生じる微小電極からの電気的ノイズの検出を低減し得る。

微小電極の各々には、外部から電気信号を付与するか、または電気信号を外部に導出するための配線部が接続され得る。代表的には、この配線部は、微小電極の各々と接続し、各電極から基板の周辺方向に引き出されたリード線を含む。配線部は、このリード線の端部に接続された、通常は基板の辺縁部に位置する電気接点をさらに含み得る。配線部の材料として好ましい例には、酸化インジウム錫（ITO）が挙げられる。

代表的には、リード線の表面は絶縁層に覆われる。絶縁層はリード線上のみに配置されてもよいが、好ましくは、微小電極上および電気接点の近傍を除いて、基板上面のほぼ全体を被覆するように配置される。絶縁層の材料として好ましい例には、加工の容易なアクリルや感光性のポリイミドが挙げられる。

#### 25 (一体化複合電極の構成)

本発明の一体化複合電極の詳細な設計にあたっては、上記の刺激用の基準電極

5

として特別に設けられた参照電極を具有することを妨げない限り、公知の一体化複合電極における任意の構造的特徴を採用し得る（例えば、特開平6-78889号公報を参考のこと）。以下に、代表的な一体化複合電極の構成例を示す。ここで記述された態様は、測定対象たる生物学的試料の特性、収集が意図される測定データの性格などの種々の要因を反映して、適宜設定、変更し得るものである。

一体化複合電極に供される基板材料としては、細胞培養後の光学的観察の便宜のために透明な絶縁性材料が好ましい。例として、石英ガラス、鉛ガラス、ホウ珪酸ガラスなどのガラス、もしくは石英などの無機物質、または、ポリメタクリル酸メチルまたはその共重合体、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタートなどの透明性を有する有機物質が挙げられる。機械的強度と透明性とに優れる無機物質が好ましい。

基板上に配置される電極材料としては、例えば、酸化インジウム錫（ITO）、酸化錫、Cr、Au、Cu、Ni、Al、Pt、などが使用され得る。なかでも、ITOおよび酸化錫が好ましく、透明性で良導電性であるITOが特に好ましい。上記の微小電極は、通常、所望の位置および形状に配置されたこれら電極材料の一部の最表面に白金黒や金などで処理を行い形成される。

複数の微小電極は、通常、最近接の電極間距離が相等しくなるように、等間隔で配置される。最近接の電極間距離は、代表的には約10から約1000μmの範囲内にあり得る。電極の形状は、代表的には、略正方形もしくは略円形であつて、1辺の長さ、もしくは直径は約20μmから約200μmの範囲内にあり得る。このような設定により、測定対象の生物学的試料、例えば、神経細胞（すなわち細胞体と樹状突起と軸索突起）の細胞体が一つの微小電極上に置かれたとき、この細胞体から伸びた細胞突起を介して隣接する別の細胞体が、隣接する電極上に位置する確率が高くなる。

複数の参照電極もまた、通常、最近接の参照電極間距離が相等しくなるように、等間隔で配置される。最近接の参照電極間距離は、代表的には、約8mmから約

1 6 mmの範囲内にあり得る。電極の形状は、代表的には、略正方形もしくは略円形であって、1辺の長さ、もしくは直径は約80 μmから約800 μmの範囲内にあり得る。このような設定により、微小電極からの発生する電気的ノイズの検出を低減し得る。

5 本発明の一体化複合電極において、上記第2の領域は、通常、上記第1の領域の周縁から約0.1 mm以上の間隔を置いて配置される。理論的には、この間隔が大きいほど参照電極がノイズを検出する確率は低くなるが、その上限値は、主に一体化複合電極の構造的特徴により規定され、代表的な一体化複合電極では、  
10 参照電極は、以下に説明する細胞設置領域を規定するリングの内径（代表的には約2.2 mmΦ）内に設置されるため、上記間隔は、通常約1.0 mmを超えることはなく、代表的には約1 mm～約1.0 mmの範囲にある。

上記第2の領域が、上記第1の領域の周縁から約0.1 mmより小さい間隔を置いて配置される場合、参照電極は、上記第1の領域に重複して配置される生物学的試料の影響を受けて隣接する微小電極とクロストークを生じ得る。

15 図9は、上記第1の領域と第2の領域の関係を示す概念図である。図9において、点線で示される3つの同心円のうち、最も内側の円に囲まれる領域が微小電極（図中小さい黒四角で表される）を含む第1の領域であって、まん中の円と最も外側の円に囲まれたドーナツ状の領域が参照電極（図中黒四角で表される）を含む第2の領域である。dは、第1の領域の周縁と第2の領域との間隔を示す。

20 微小電極と接続するリード線もまた、上記の電極材料から作製され、やはりITOが好ましい。通常、このような電極材料を基板上に蒸着した後、フォトレジストを用いてエッチングすることにより、微小電極の最下層、およびリード線を含む配線部が、一体として、所望のパターンに形成される。このとき、微小電極の最下層および配線部の厚みは、およそ500～5000オングストローム程度  
25 であり得る。

代表的には、リード線は、各微小電極から略放射状に伸ばした形状に配置され

る。この略放射状の形状の配置と組み合わせて、複数の微小電極の中心点を、 $8 \times 8$  の格子上の各交点に位置させることが特に好ましい。

リード線を被覆し絶縁するための絶縁層の材料としては、例えばポリイミド（PI）樹脂、エポキシ樹脂などの透明な樹脂が用いられ得る。ネガティブフォトセンシティブポリイミド（NPI）などの感光性樹脂が好適である。感光性樹脂の絶縁層材料を用いた場合、例えば、フォトエッチングによるパターン形成を利用して、微小電極上の絶縁層部分に孔を開けて、微小電極のみを露出させることができとなる。このように、絶縁層は、各微小電極上および外部回路との電気接点の近傍を除いて、絶縁基板のほぼ全面を被覆するように設けられることが、生産効率などの点で好ましい。

#### (細胞電位測定装置およびシステム)

本発明の一体化複合電極を、神経細胞などの測定に有効に活用するためのシステムにおける種々の構成要素の設計にあたっては、公知の細胞電位測定システムにおける任意の特徴を採用し得る（例えば、特開平8-62209号公報を参照）。

本発明の一体化複合電極は、通常、複合電極上で細胞培養を容易にするための構造、および所望により複合電極自体の取り扱いを容易にするための構造が加えられて、一体化細胞設置器として提供され得る。

代表的には、複合電極上で細胞培養のためには、上記絶縁層で基板のほぼ全面が被覆された基板上に、絶縁層を介して、培養液を保持し得る構造部分を付加し得る。このような培養液保持構造として、例えば、ポリスチレン製の円筒状の枠を、複数の微小電極を囲む上記第1の領域および参照電極を含む第2の領域を囲むように基板上に固定し得る。このとき、ポリスチレン枠の内側が、細胞設置領域を規定する。

一体化複合電極を細胞測定に用いる際の取り扱いを容易するために、一体化複合電極は、例えば、プリント配線板を組み合わせることができる。プリント配線板は、一体化複合電極の電気接点と導電接続する導電パターンを有することに

より、微小電極から電気接点に至る電気接続をさらに外部に引き出す役割を果たす。プリント配線板と一体化複合電極との電気接続を保持しつつ、両者を確実に固定するために、さらに、適切な形状のホルダ、例えば、複合電極を上下から挟む形状の2分割式ホルダを用いることができる。

5 上記一体化細胞設置器に、出力信号処理装置をさらに組み合わせることにより、複合電極上に配置された細胞に電気的刺激を与え、その応答としての出力信号を処理するための細胞電位測定装置が構成され得る。

10 刺激信号付与装置は、上記複数の微小電極のうちの任意の微小電極と刺激用参考電極との間に刺激信号を印加し得る。刺激信号に細胞が応答することによって、他の電極において誘発電位の変化が得られ、出力信号として信号処理装置に与えられる。出力信号は、適切な信号処理を経て、例えば表示装置などに出力される。なお、刺激信号を受けることなく細胞において発生する自発電位の測定も、同時に行われ得る。

15 刺激信号付与装置および出力信号処理装置は、代表的には、適切な測定用ソフトウェアを備えたコンピュータによって一体として構成される。測定用ソフトウェアは、コンピュータの画面上に、刺激条件などを設定し得るパラメータ設定画面、細胞から検出された電位変化を記録し、リアルタイムで多チャンネル表示し得る記録画面、および記録されたデータを解析し得るデータ解析画面などを与える。好ましくは、コンピュータからの刺激信号は、D/A変換器を介して一体化複合電極へと出力され、そして細胞からの出力信号は、A/D変換器を介してコンピュータに入力される。

20 細胞電位測定装置にさらに、光学観察装置と細胞培養装置とを組み合わせることにより、神経細胞を長期間にわたって培養し、その電気生理学的活動を安定にかつ正確に測定することを可能にする、細胞電位測定システムが構築され得る。  
25 光学観察装置としては、倒立顕微鏡の他に、高精細度ディスプレーおよび画像ファイル装置を備えた、顕微鏡用のS I Tカメラを用いることができる。

細胞培養装置としては、培養雰囲気の温度調節、培養液の循環、空気および二酸化炭素の混合ガスの供給などを制御し得る任意の機器または機器類の組み合わせを用いることができる。

上記本発明の、一体化複合電極、一体化細胞設置器、細胞電位測定装置、または細胞電位測定システムを用い、例えば、被験試料である神経細胞に電流または電圧刺激を加え、それに対する応答として得られる電気的信号のパターンを観察することによって神経ネットワークの解析等が可能となる。所定の化合物の存在下および非存在下でこのような電気的信号のパターンを得てそれぞれのパターンを比較すれば、被験試料に作用する化合物をスクリーニングすることも可能である。  
10

また、例えば、神経細胞に作用することが知られている化合物の存在下でこのような電気的信号のパターンを得、神経作用性物質に関する電気的信号のパターンのデータベースが構築され得る。

一旦、このようなデータベースが構築されると、神経細胞に対する作用が未知の化合物について、この化合物の存在下で得られる電気的信号のパターンを、上記データベースと比較することにより、この化合物の神経細胞に対する作用と同様に作用する既知化合物を識別することによって、この化合物の作用様式もまた推定され得る。  
15

従って、本発明の一体化複合電極、一体化細胞設置器、細胞電位測定装置、または細胞電位測定システムはまた、薬品スクリーニング装置としても用いられ得る。  
20

### 実施例

以下、本発明をより具体的に例示する。これらの実施例は、本発明を限定するものではない。  
25

(実施例 1)

細胞の電気生理学的特性を測定するための、本発明の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の概略ブロック図を図1に示す。そして比較のために、従来の一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置の概略ブロック図を図2に示す。

本発明の一体化複合電極(10)は、図1中の点線4で囲まれた略正方形の領域中にマトリックス状に配置された64個の微小電極(3a)(サイズ $50 \times 50 \mu\text{m}$ )の微小電極の各々の中心部が、 $8 \times 8$ の格子上の各交点に位置する)、4個の参照電極(5a:測定用参照電極、5b:刺激用参照電極)(サイズ $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ )の参照電極の各々の中心部が、一辺が約8.5mmの正方形の各頂点に位置する。このとき第1の領域と第2の領域との距離は約5mmである)を備え、刺激信号付与装置1および細胞電位測定装置2に接続されている。刺激用参照電極(5b)および測定用参照電極(5a)は、それぞれ、約 $0.04 \text{ m}^2$ の表面積を有する。刺激用参照電極(5b)は、測定用参照電極(5a)と電気回路的に独立して配置されている。なお、図1、2、5および6に示される測定用参照電極間の点線および刺激用参照電極間の一点鎖線は、それぞれ電気的短絡を示す。これは、通常、アンプ内の電気回路によって短絡されていることにより形成される電気的短絡である。

まず最初に、図1に示す装置を用い、電極上に被測定物を置かずに、10マイクロAの定電流を双極性のパルス(パルス幅100マイクロ秒)として、図1に示す、マトリックスの第2行第6列目にある微小電極に刺激として与え、各微小電極におけるノイズレベルの測定とアーチファクトの影響を調べた。ノイズレベルの測定は、微小電極の各々に対応する64チャンネルで表示したコンピュータ一画面に各電極における誘発電位応答を表示させることにより行った。なお、微小電極の各々は、基板上のリード線(図示せず)、A/D変換器を介してコンピューターに接続された。

64個の微小電極の各々の応答は、上記定電流双極性パルスの刺激前5ミリ秒から刺激後20ミリ秒までの間64チャンネルをモニターした。結果を図3に示

す。

対照として、図2に示す従来の方式の一体化複合電極を備えた装置を用い、図2に示すマトリックス第2行第6列目の微小電極を含む一对の微小電極間に、上記と同じ10マイクロAの定電流を双極性のパルスとして与えて64チャンネルをモニターした。結果を図4に示す。

図4に示されるように、対照の装置では、刺激電極として使用されたマトリックス第2行第6列目の微小電極において、鋸状の波形で示されるように非常にノイズレベルが高かった。また、刺激微小電極周辺の微小電極においても、アーチファクトが大きく、定常電位へ復帰するために、5～20ミリ秒の時間を要した。

それに対し、本願の一体化複合電極を備えた装置では、図3に示されるように、マトリックス第2行第6列目の微小電極においてノイズはほとんど検出されず、また刺激電極周辺の微小電極においてもアーチファクトが非常に小さかった。

#### (実施例2)

本発明の一体化複合電極を備えた図1に示す装置を用い、そしてさらに図5に示す4つの刺激用参照電極を有する一体化複合電極を備えた細胞電位測定装置を作製し、実際にラットの海馬切片（脳）を用いて、微小電極の各々における誘発電位の測定を行った。

図5に示す装置において、4個の刺激用参照電極は、一辺が約8.5mmのほぼ正方形の頂点に配置した。この装置のその他の構成は図1に示す装置と同じである。この装置を用いて、実際にラットの海馬切片（脳）を用いて、微小電極の各々における誘発電位の測定を行った。図5は、ラットの海馬切片7を装置に配置した状態を示す概略ブロック図である。

海馬切片は、4週令のSD/slcラットをフローセンで麻酔した後、断頭し全脳を摘出して得た。摘出した脳を直ちに氷冷下リンゲル液で冷却し、海馬のみを含む脳断片を切り出した。次いで、切り出した脳断片を、組織切断化装置で、300ミクロンの厚さの切片とし、この切片を微小電極上に置き試験に供した。

誘発電位の測定は、実施例 1 と同様に、10 マイクロA の定電流を双極性のパルス（パルス幅 100 マイクロ秒）として用い、図 1 に示す装置では、マトリックス第 2 行第 2 列めの微小電極に、そして図 5 に示す装置では、マトリックス第 2 行第 6 列目の微小電極に与えて行った。測定結果のコンピュータ画面を図 7 に示す。図 7 は、図 5 に示す装置を用いた場合の測定結果である。図 8 は、対照として、図 6 に示す、従来型の一体化複合電極を備えた装置用い、図 6 のマトリックス第 2 行 6 列目の微小電極を含む一対の微小電極間に上記と同じ 10 マイクロ A の定電流を双極性のパルスとして与えて同様の試験を行った結果を示す図である。

図 8 に示されるように、従来型の一体化複合電極では、ほとんどのチャンネルにおいて、ベースラインの下にあって極小点をもつ波で示される神経細胞の電気信号は、その定常電位に復帰するのに 20 ミリ秒以上（図 8 のチャンネル画面において横軸 4 目盛り以上）を要したのに対し、図 7 に示される本発明の一体化複合電極を用いた場合には、すべてのチャンネルにおいて、細胞の電気信号は、20 ミリ秒以内に定常電位に復帰した。図 1 に示す装置を用いた場合も、すべてのチャンネルにおいて、細胞の電気信号は、20 ミリ秒以内に定常電位に復帰した。このように本発明の一体化複合電極を備えた装置では、ノイズレベルが低くアーチファクトの影響も小さい状態で良好に誘発電位の測定が可能であった。

以上、本発明を実施例を参照して説明したが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲内で、当業者の知識に基づき種々なる改良、修正、変形を加えた態様で実施できる。

#### 産業上の利用可能性

外部雑音の影響を受けにくく、刺激によるアーチファクトを低減し、細胞の電気的信号を記録するのに適した一体化複合電極が提供される。

## 請求の範囲

1. 生物学的試料の電気生理学的特性を測定するための一体化複合電極であつて、

5 基板上の第 1 の領域に配置された複数の微小電極、および  
基板上の第 2 の領域に配置された参照電極を備え、  
該参照電極が、微小電極に電気信号を付与するための 1 つ以上の刺激用参照電  
極を含む、一体化複合電極。

10 2. 前記参照電極が、前記複数の微小電極からの電気信号を検出するための 1  
つ以上の測定用参照電極を含み、前記刺激用参照電極が、該測定用参照電極と電  
気回路的に絶縁されている、請求項 1 に記載の一体化複合電極。

15 3. 前記第 2 の領域が、前記第 1 の領域の周縁から間隔を置いて配置され、か  
つ前記第 1 の領域を取り囲む、請求項 1 または 2 に記載の一体化複合電極。

4. 前記生物学的試料が、前記第 1 の領域と重複し、かつ前記第 2 の領域とは  
15 重複しないように配置される、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の一体化複合電  
極。

5. 前記間隔が、電気信号が付与される微小電極から発生する電気信号を検出  
し、かつ電気信号が付与されない微小電極から発生する電気的ノイズを検出しな  
いように設定される、請求項 3 または 4 に記載の一体化複合電極。

20 6. 複数の刺激用参照電極および複数の測定用参照電極を備え、刺激用参照電  
極の各々または測定用参照電極の各々が、前記第 1 の領域の中心に関して互いに  
ほぼ対称に配置される、請求項 2 から 5 のいずれかに記載の一体化複合電極。

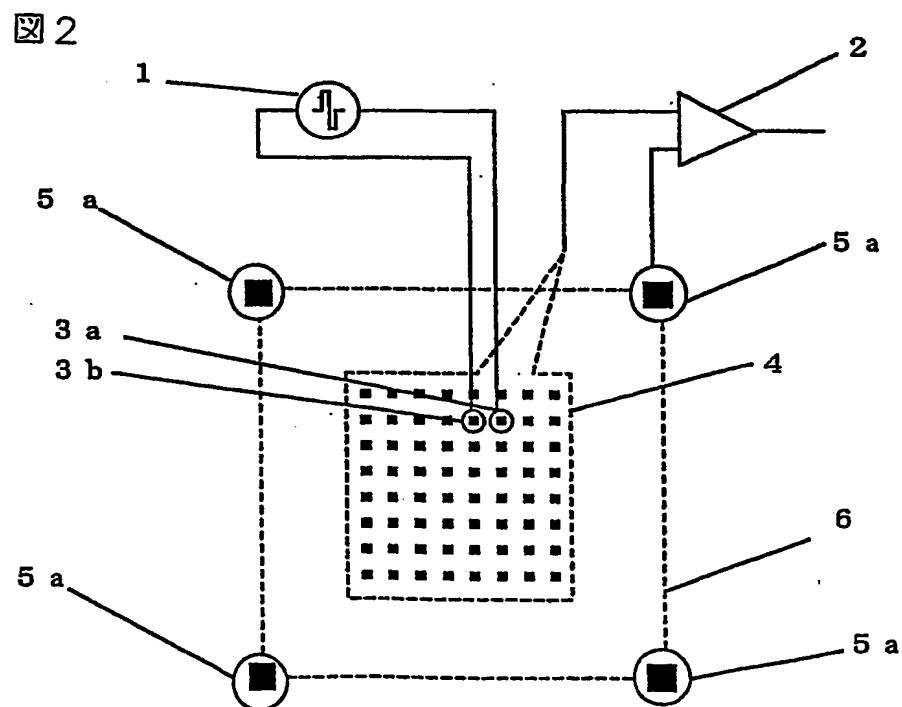
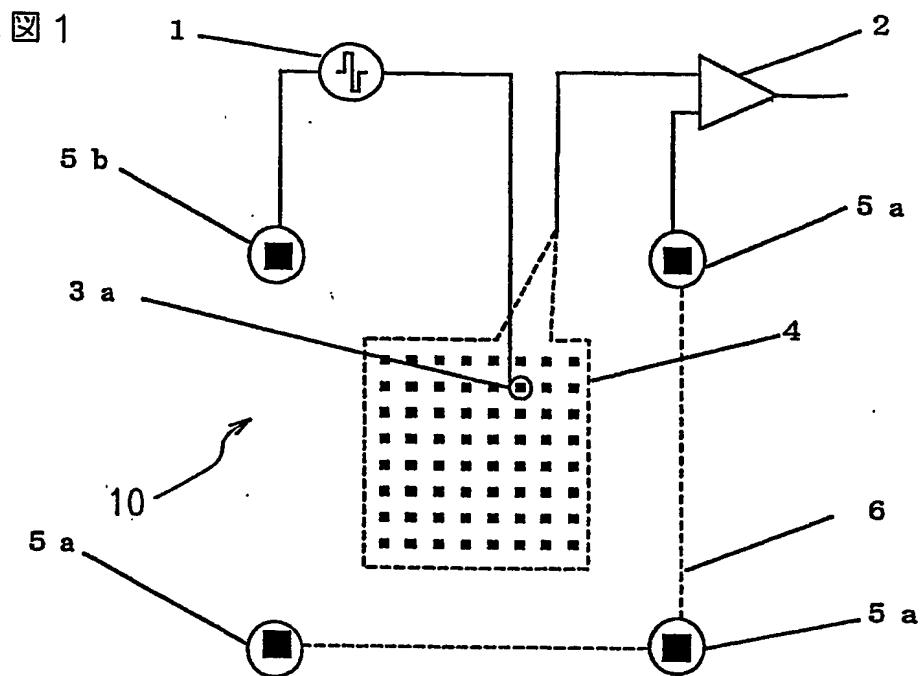
7. 前記複数の微小電極が前記第 1 の領域内でマトリックス状に配置される、  
請求項 1 から 6 のいずれかに記載の一体化複合電極。

25 8. 請求項 1 から 7 のいずれかに記載の一体化複合電極を備え、該一体化複合  
電極の基板上に生物学的試料を置くための細胞設置領域を有する、一体化細胞設  
置器。

9. 請求項 8 に記載の一体化細胞設置器と、生物学的試料の電気生理学的活動  
による出力信号を処理するために該微小電極に接続される出力信号処理装置を備

え、さらに必要に応じて生物学的試料に電気的刺激を与えるために前記微小電極に接続される刺激信号付与装置を備えた、細胞電位測定装置。

10. 請求項9に記載の細胞電位測定装置を備え、さらに、生物学的試料を光学的に観察するための光学観察装置および／または生物学的試料の培養環境を制御するための細胞培養装置を備えた、細胞電位測定システム。  
5



*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

図 3

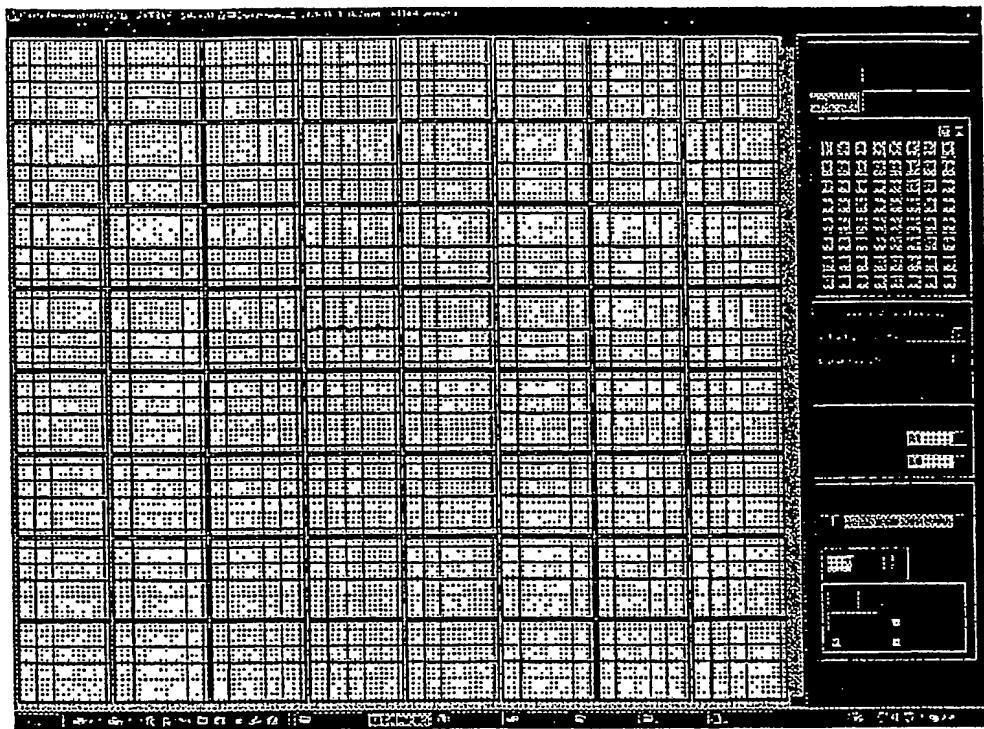
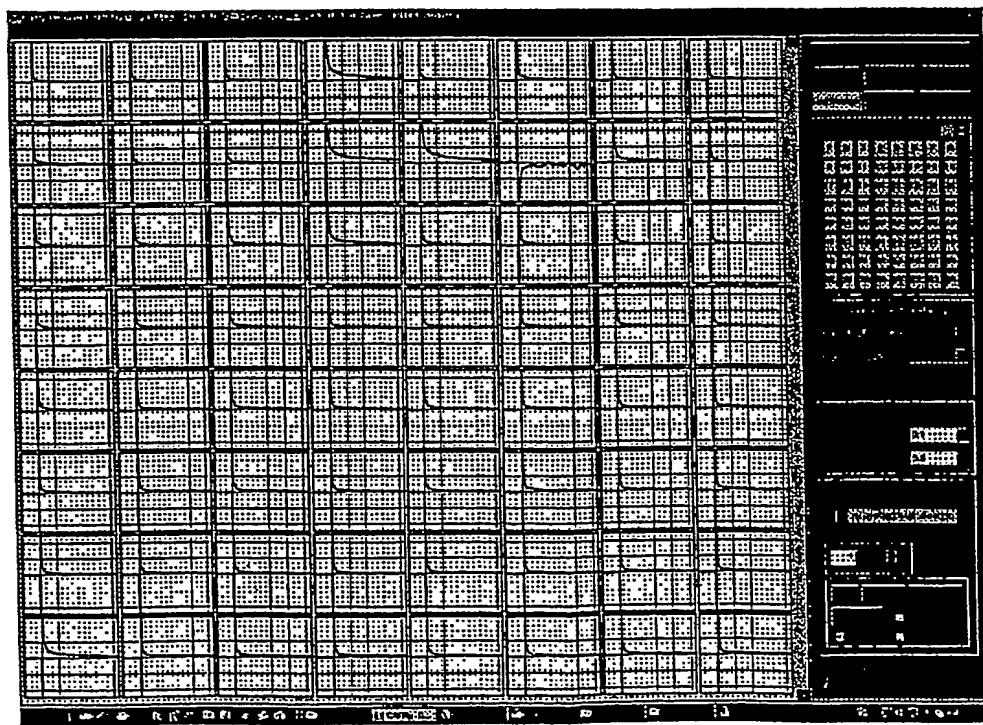


図 4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 5

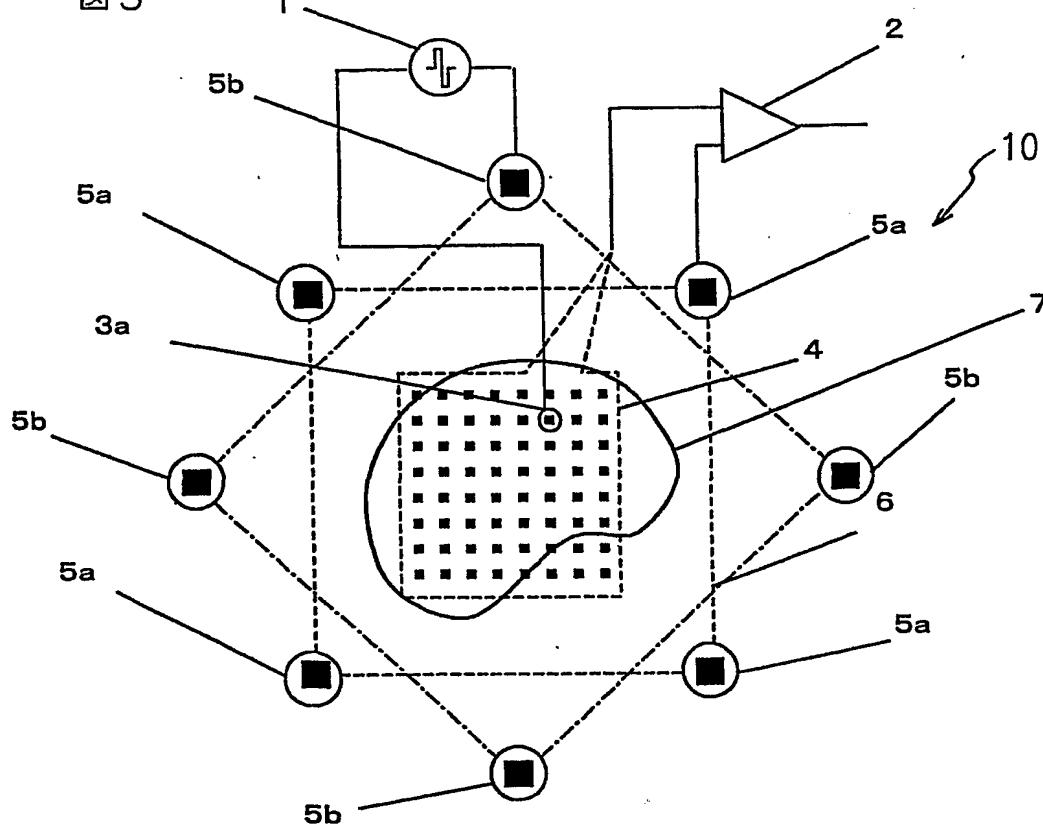
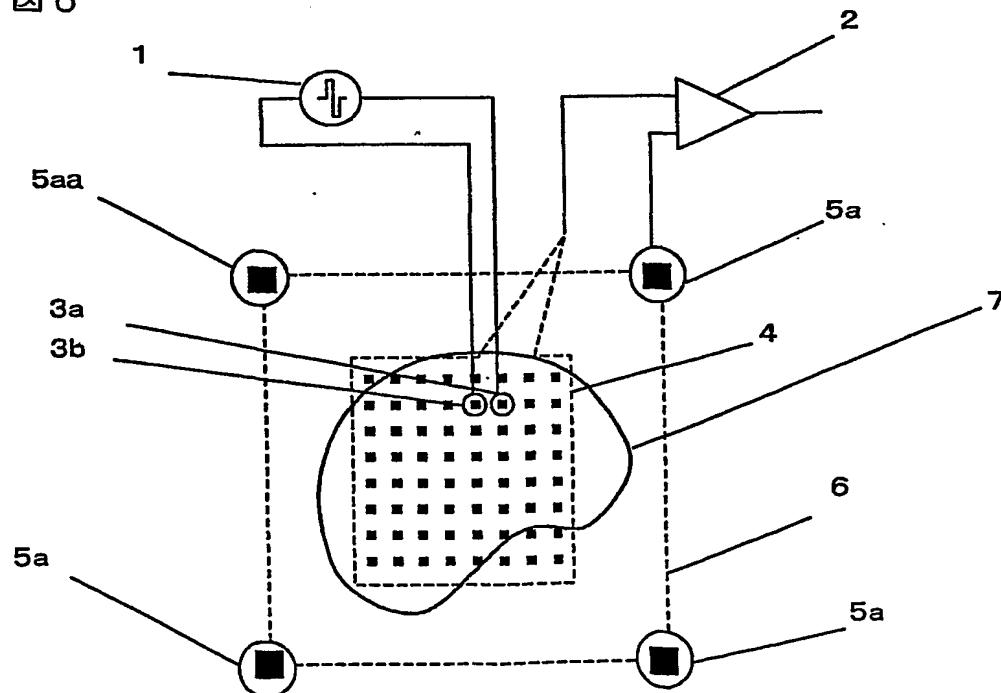
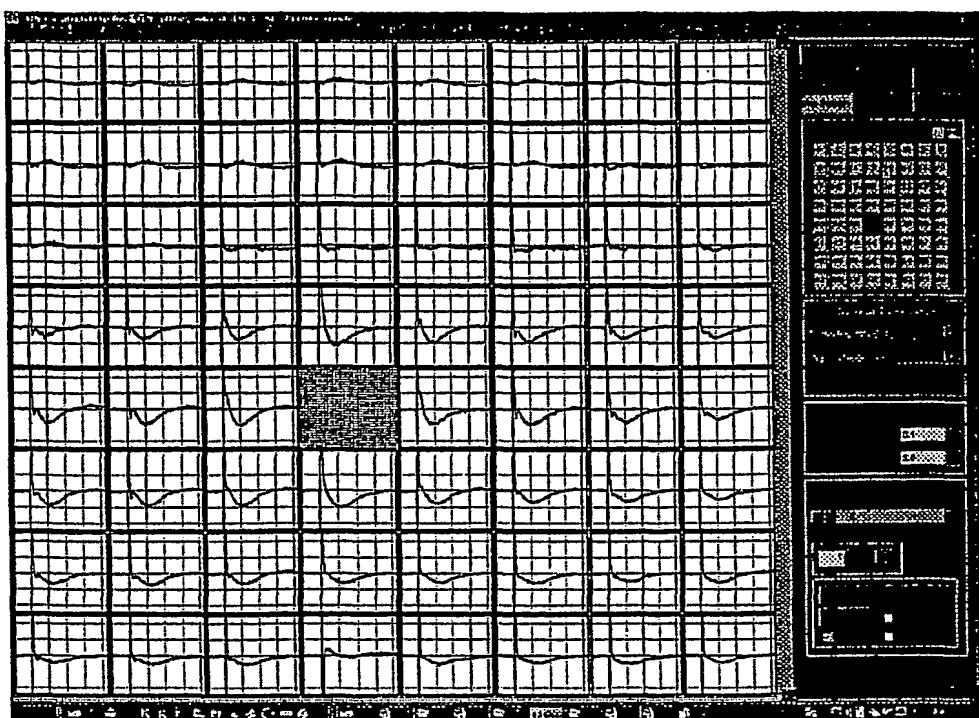


図 6



THIS PAGE BLANK (USPS10)

图 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 8

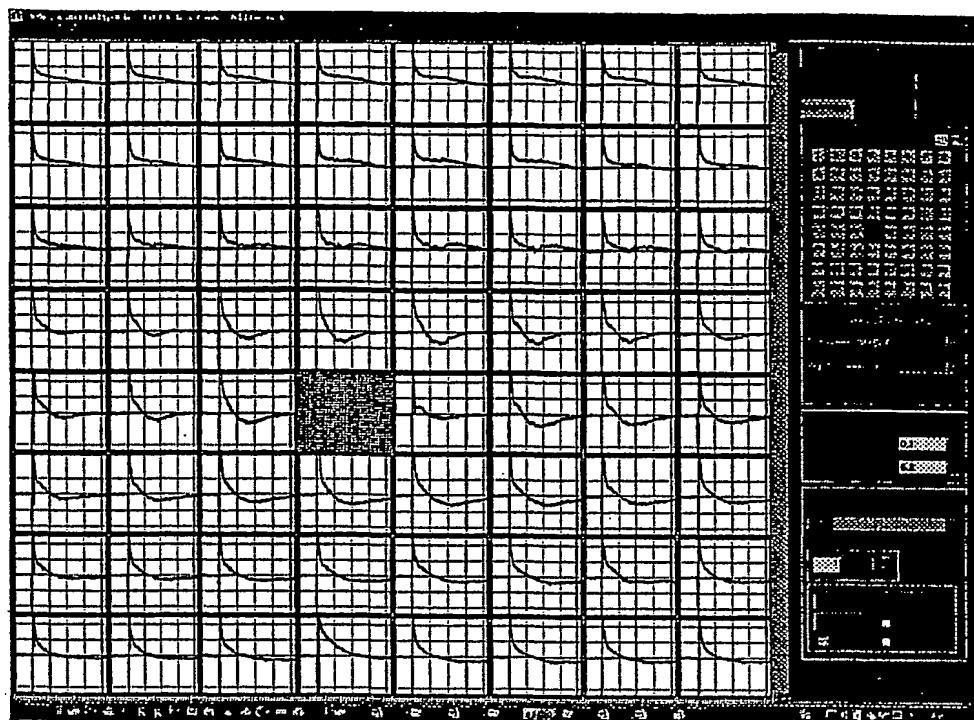
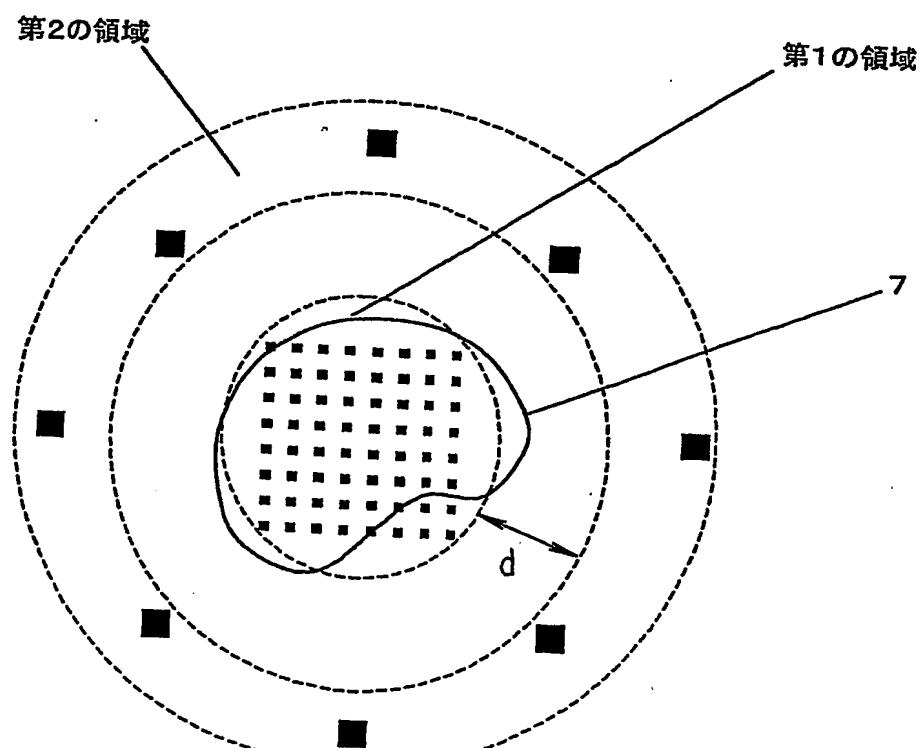


図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06067

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N27/30, G01N27/416, C12M1/00, G01N33/483

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N27/30, G01N27/416, C12M1/00-3/04, G01N33/483, A61B5/0492, 5/0408

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 JICST FILE (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/34202 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 08 July, 1999 (08.07.99), Full text; Figs. 1 to 12 & JP 11-187865 A & EP 1040345 A & CN 1284166 T	1-10
A	DE 19827957 A1 (Micronas Intermetall GmbH), 09 December, 1999 (09.12.99), Full text & JP 11-346794 A	1-10
A	EP 585933 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 09 March, 1994 (09.03.94), Full text & JP 6-78889 A	1-10
A	EP 689051 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 27 December, 1995 (27.12.95), Full text; Figs. 1 to 12 & JP 8-62209 A & CN 1131774 A & US 5563067 A1 & KR 150390 B	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 30 August, 2001 (30.08.01)	Date of mailing of the international search report 11 September, 2001 (11.09.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06067

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5810725 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 22 September, 1998 (22.09.98), Full text; Figs. 1 to 8 & EP 585933 A2 & JP 6-296595 A & US 6151519 A	1-10
A	JP 2000-333921 A (Makoto ISHIDA), 05 December, 2000 (05.12.00), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-10
A	JP 4-204244 A (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.), 24 July, 1992 (24.07.92), Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none)	1-10
A	Hirokazu SUGIHARA et al., "Saibou Den-i System oyobi Dainou Hishitsu Hattatsu Katei Kenkyu e no Ouyou", National Technical Report, April, 1996, Vol.42, No.2, pages 260 to 267	1-10
A	Isao KAETSU et al, "Denkyoku Souchaku Kairo e no Shinkei Saibou no Kotei-ka to Baiyou", Jinkou Zouki, (1997), Vol.26, No.3, pages 767 to 771	1-10
A	Norito KONNO et al., "Ta-Channel Katsudou Den-i Kaiseki ni yoru Baiyou Shinkei Kairo-mou Nai Koufun Denpan Keiro no Suitei", Dengaku-ron C, (1998), Vol.118, No.7/8, pages 999 to 1006	1-10

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C17 G01N27/30, G01N27/416, C12M1/00, G01N33/483

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

G01N27/30, G01N27/416, C12M1/00-3/04

Int. C17 G01N33/483, A61B5/0492, 5/0408

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  
JICST文献ファイル（JOIS）

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/34202 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 8.7月.1999(08.07.99) 全文、第1-12図 & JP 11-187865 A & EP 1040345 A & CN 1284166 T	1-10
A	DE 19827957 A1 (Micronas intermetall GMBH) 9.12月.1999(09.12.99) 全文 & JP 11-346794 A	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

30.08.01

## 国際調査報告の発送日

11.09.01

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官（権限のある職員）

黒田 浩一

2 J 9218



電話番号 03-3581-1101 内線 3250

## C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 585933 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 9.3月.1994 (09.03.94) 全文 & JP 6-78889 A	1-10
A	EP 689051 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 27.12月.1995 (27.12.95) 全文、第1-12図 & JP 8-62209 A & CN 1131774 A & US 5563067 A1 & KR 150390 B	1-10
A	US 5810725 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 22.9月.1998 (22.09.98) 全文、第1-8図 & EP 585933 A2 & JP 6-296595 A & US 6151519 A	1-10
A	JP 2000-333921 A (石田 誠) 5.12月.2000 (05.12.00) 全文、第1-3図 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 4-204244 A (松下電器産業株式会社) 24.7月.1992 (24.07.92) 全文、第1-2図 (ファミリーなし)	1-10
A	杉原宏和他、細胞電位測定システムおよび大脳皮質発達過程研究 への応用、National Technical Report, 4月.1996, 第42巻、第2号、 p260-267	1-10
A	嘉悦勲他、電極装着回路への神経細胞の固定化と培養、人工臓 器、1997、第26巻、第3号、p767-771	1-10
A	今野徳人他、多チャンネル活動電位解析による培養神経回路網内 興奮伝搬経路の推定、電学論C、1998、第118巻、第7/8号、 p999-1006	1-10

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
 [PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F 5 - 0 1 P C T 4 7 2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP01/06067	国際出願日 (日.月.年) 12.07.01	優先日 (日.月.年) 13.07.00
出願人(氏名又は名称) 松下電器産業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
  - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
  この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
  - b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
  この国際出願に含まれる書面による配列表
  この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
  出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
  書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は
  出願人が提出したものと承認する。
  次に示すように国際調査機関が作成した。

---

5. 要約は
  出願人が提出したものと承認する。
  第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
 第5図とする。 出願人が示したとおりである。  なし
  - 出願人は図を示さなかった。
  - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N27/30, G01N27/416, C12M1/00, G01N33/483

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

G01N27/30, G01N27/416, C12M1/00-3/04

Int. Cl' G01N33/483, A61B5/0492, 5/0408

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2001年

日本国登録実用新案公報 1994-2001年

日本国実用新案登録公報 1996-2001年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST文献ファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/34202 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 8.7月.1999(08.07.99) 全文、第1-12図 & JP 11-187865 A & EP 1040345 A & CN 1284166 T	1-10
A	DE 19827957 A1 (Micronas intermetall GMBH) 9.12月.1999(09.12.99) 全文 & JP 11-346794 A	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

30.08.01

## 国際調査報告の発送日

11.09.01

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

黒田 浩一

印 2 J 9218

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	EP 585933 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 9.3月.1994 (09.03.94) 全文 & JP 6-78889 A	1-10
A	EP 689051 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 27.12月.1995(27.12.95) 全文、第1-12図 & JP 8-62209 A & CN 1131774 A & US 5563067 A1 & KR 150390 B	1-10
A	US 5810725 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd) 22.9月.1998(22.09.98) 全文、第1-8図 & EP 585933 A2 & JP 6-296595 A & US 6151519 A	1-10
A	JP 2000-333921 A (石田 誠) 5.12月.2000(05.12.00) 全文、第1-3図 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 4-204244 A (松下電器産業株式会社) 24.7月.1992 (24.07.92) 全文、第1-2図 (ファミリーなし)	1-10
A	杉原宏和他、細胞電位測定システムおよび大脳皮質発達過程研究 への応用、National Technical Report, 4月.1996, 第42巻、第2号、 p260-267	1-10
A	嘉悦勲他、電極装着回路への神経細胞の固定化と培養、人工臓 器、1997、第26巻、第3号、p767-771	1-10
A	今野徳人他、多チャンネル活動電位解析による培養神経回路網内 興奮伝搬経路の推定、電学論C、1998、第118巻、第7/8号、 p999-1006	1-10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**